

## 곡물류의 형질전환 유도에 관한 연구 V. Electroporation에 의한 밀의 형질전환

송정원 · 정병균 · 배동규 · 임형탁 남백희<sup>1</sup> · 정현숙<sup>2</sup> · 황백\*  
전남대학교 생물학과, 명지대학교 생물학과, 조선대학교 유전공학과<sup>2</sup>

### Studies on the Induction of Transformation in Cereal Plants V. Transformation of Wheat by Electroporation

Jeong Won SONG, Byung Kyun JUNG, Dong Gyu BAI, Hyoung Tak IM,  
Baek Hie NAHM<sup>1</sup>, Hyeon Sook CHEONG<sup>2</sup>, and Baik HWANG\*

Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju, 500-757; <sup>1</sup>Department of Biology, Myongji University, Youngin, 449-728; and <sup>2</sup>Department of Genetic Engineering, Chosun University, Kwangju, 501-759 \*Corresponding author.

Wheat (*Triticum aestivum* L. cv Cho-Kwang) explants were transformed by electroporation. Excised root segments were electroporated with plasmid DNA of pBI121 and transferred to medium containing 300 mg/L kanamycin. Transformed calli formed within 5-7 days of culture and were selected from electroporated tissue on medium containing kanamycin after 4 weeks. The highest transformation frequency was obtained after electroporation with a pulse of 200 V/800  $\mu$ F and calli formed at frequencies up to 2.5%. GUS ( $\beta$ -glucuronidase) assay and dot blot analysis showed that the foreign gene was capable of expressing in root explants subjected to electroporation and calli derived from the explants.

**Key words:** dot blot analysis, excised root,  $\beta$ -glucuronidase, *Triticum aestivum* L

식물조직배양 및 분자생물학적 기법을 이용하여 형질전환 식물체를 효율적으로 유도할 수 있는 체계를 확립함으로써 주요 경제작물인 곡물류에 적용시켜 유용한 형질을 갖는 작물생산을 기대할 수 있다. 고등식물 세포내로 외래 유전자 도입은 토양 미생물인 *Agrobacterium*의 감염을 이용하여 많은 식물 종에서 사용되고 있으나 대부분 화분과 식물의 경우 숙주제한 때문에 많은 어려움에 직면해 있다. (Graves and Goldmann, 1986; Shafer et al., 1987). 따라서 이러한 문제점을 극복하기 위해 개발된 직접 유전자도입 방법 즉, PEG (Lindsey and Jones, 1987a; Lorz et al., 1985; Paszkowski et al., 1984; Potrykus et al., 1985), electroporation (From et al., 1986; Shillito et al., 1985; Toriyama et al., 1988), particle gun (Morikawa et al., 1989; Oard et al., 1990), microinjection (Lawence and Davies, 1985; Joshi and Vincentini, 1990) 등을 이용하고 있으나 이러한 방법들의 경

우에는 대부분 원형질체 또는 세포수준에서의 배양조건이 선결되어야 한다.

최근 효소처리에 의한 상처(Lindsey and Jones, 1987a)와 기계적 자극에 의한 상처부위(Dekeyser et al., 1990; D'Halluin et al., 1992)를 통한 조직수준에서의 electroporation에 관한 몇몇 보고들이 있는데, 특히 Dekeyser 등(1990)은 벼의 엽초와 기저부 등의 조직내로 electroporation에 의해 DNA를 도입함으로써 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

밀에서의 형질전환 유도는 유전적 요인에 따른 배발생 세포의 현탁배양과 원형질체 배양의 어려움(Ahloowalia, 1982; Harris et al., 1988; Karp et al., 1987)으로 인하여 극히 제한적으로 이루어지고(Hess et al., 1990; Oard et al., 1989; Vasil et al., 1991, 1992; Zhou et al., 1990) 있으며, 아직 완전한 배양체계가 확립되지 못하고 있는 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 벼에서의 형질전환 기법으로부터 얻은 일련의 실험

결과(Hwang et al., 1990, 1993)들을 토대로 NPT II와 GUS 유전자가 들어있는 pBI 121 plasmid DNA를 분리, 이를 electroporation에 의해 밀의 조직내에 도입시킨 후 외래 유전자가 도입된 형질전환 캘러스를 유도함으로써 주요 경제 작물인 밀에서의 유용유전자 도입 가능성을 높이며 아울러 배양이 용이한 조직 및 기관 수준에서의 형질전환 가능성을 조사하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 식물재료 및 배양

밀(*Triticum aestivum* L. cv Cho-Kwang) 성숙종자를 0.1% mercuric chloride에 5분, 5% sodium hypochloride 용액에 20 분간 침윤시켜 표면 살균한 후 무균수로 세번 세척하여 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에서 발아시켰으며, 25°C 암조건 하에서 일주일 동안 발아 성장한 뿌리조직

을 5 mm의 절편으로 만들어 형질전환 재료로 사용하였다.

#### Plasmid DNA 분리

균주는 pBI 121 plasmid (Fig. 1)가 들어있는 *A. tumefaciens* strain LBA 4404를 사용하였으며, pBI 121의 증식은 Maniatis 등(1982)의 방법에 따라 *E. coli* (HB 101)로 형질전환시켜 kanamycin 100 mg/L이 포함된 LB 배지 (Trypton 10 g/L, Yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0)에서 대수증식으로 배양한 후 alkaline extraction (Maniatis et al., 1982)방법에 의해 plasmid DNA를 분리하였으며 UV-spectrophotometer를 이용하여 DNA농도를 측정, 사용하였다.

#### Kanamycin 내성 조사

밀 뿌리조직의 kanamycin 내성 정도를 조사하기 위하여 2,4-D 0.5 mg/L이 첨가된 MS 배지에 kanamycin 농도를 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 800 mg/L까지 첨가하여 조직 절편을 배양한 다음 3주 후 캘러스 형성률을 조사하였다.

#### 형질전환 및 배양

뿌리조직의 절편을 electroporation buffer (Hauptmann et al., 1987)에 1회 세척한 후 재현탁시켜 50-100 µg/ml의 plasmid DNA와 함께 electroporation chamber에 넣고 전압과 capacitance를 각각 달리하여 4°C하에서 electroporation하였다. electroporation이 끝난 후 4°C에서 10분간 정지시킨 다음 배양배지로 세척한 조직을 2,4-D 0.5 mg/L, kanamycin 300 mg/L이 첨가된 MS 배지에 배양하여 캘러스를 유도하였다.

#### GUS 활성의 분광분석(Spectrophotometric Assay)

Jefferson 등(1987)의 방법에 따라 kanamycin이 첨가된 배지에서 배양을 통하여 선별된 캘러스는 완충용액(50 mM sodium phosphate, pH 7.0, 10 mM β-mercaptoethanol, 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.1% sarkosyl)이 첨가된 막자사발에서 마쇄한 다음 그 추출물을 반응용액(50 mM sodium phosphate, pH 7.0, 1 mM β-nitrophenyl-β-D-glucuronide, 10 mM β-mercaptoethanol, 0.1% Triton X-100)에 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 2.5 M 2-amino-2-methyl-1, 3-propanediol을 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 분광광도계를 이용하여 415 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

#### GUS 활성의 분광 형광분석(Fluorometric Assay)

배양 4주 후 kanamycin 선발배지에서 유도된 캘러스를 위

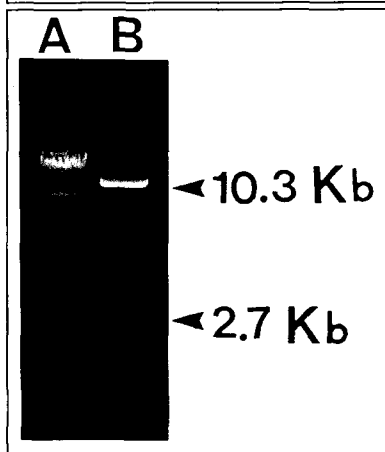
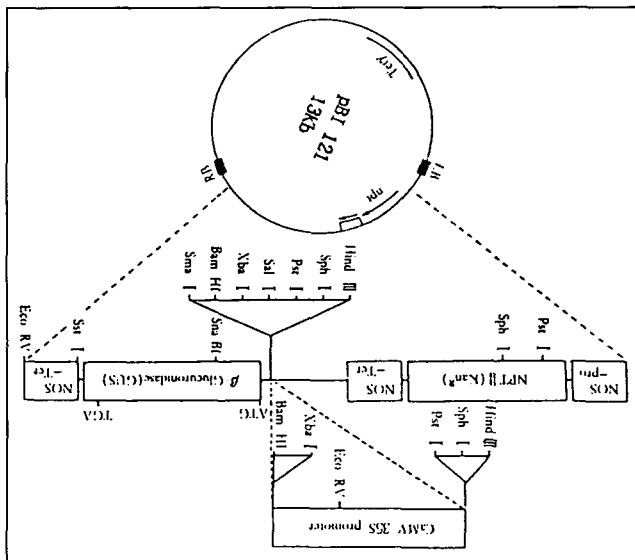


Figure 1. Agarose gel electrophoretic pattern of plasmid pBI 121 which employed in electroporation. The 13 Kb DNA fragment LB, RB, NPT II gene, GUS gene. Lane A: Hind III-cut λ DNA; Lane B: pBI 121.

와 동일한 완충용액에 넣고 막자사발에서 마쇄한 다음 4°C에서 5분 동안 원심분리시킨 후, 상등액을 반응액(1 mM methyl umbelliferyl glucuronide)과 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 그런다음 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>을 넣어 반응을 중지시킨 뒤 분광 형광계를 사용하여 365 nm에서 여기시켜 455 nm에서 방사측정 하였으며 UV하에서 관찰하였다.

### GUS 활성의 조직화학적 분석(Histochemical Assay)

GUS 활성의 조직화학적 분석은 배양을 통하여 선별된 캘러스를 고정액(0.3% formaldehyde, 10 mM MES, pH 5.6, 0.3 M mannitol)에서 45분간 고정한 후 50 mM NaPO<sub>4</sub> (pH 7.0)로 2-3회 세척한 다음 반응용액(2 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide, 0.1 M sodium phosphate, pH 7.0, 0.5 mM potassium ferricyanide, 10 mM dithiothreitol)과 37°C에서 16시간동안 반응 시킨 뒤 70% ethanol로 5분간 세척하여 현미경 하에서 관찰하였다.

### Dot Blot Hybridization

절편으로부터 유도된 캘러스의 total genomic DNA 분리는 Dellaporta 등(1983)의 방법에 따라 동결건조된 0.5 g의 시료를 액체질소로 마쇄하여 DNA 완충용액(100 mM Tris HCl, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoethanol, pH 8.0)에 녹인 다음 20% SDS, 5 M potassium acetate 처리와 isopropanol 침전을 통하여 분리된 DNA를 Tris-EDTA 완충용액에 녹여 사용하였다. 분리시킨 DNA 5 μg을 Nytran membrane에 점적한 후 변성, 중화시킨 다음 80°C의 진공오븐에서 2시간 동안 baking하고 prehybridization 용액에서 4시간 동안 hybridization을 시켰다. 그후 probe를 첨가하여 68°C에서 18시간 동안 hybridization 시킨 다음 3x SSC와 0.1% SDS로 세척하고 건조시킨 다음 X-ray film에 감광시켰다. 이때 probe는 <sup>32</sup>P로 표지된 2.17 kb GUS Nos-poly A probe를 사용하였다.

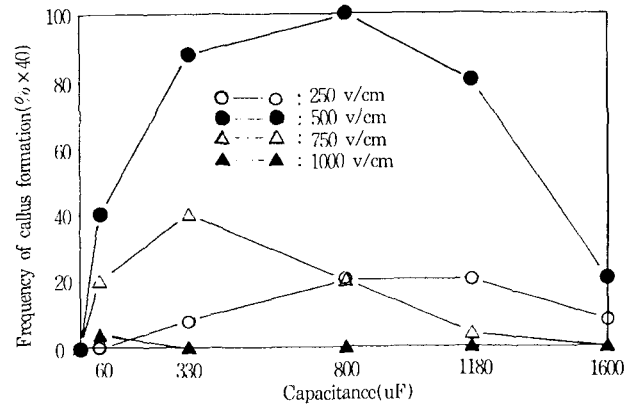
## 결과 및 고찰

형질전환의 벡터로서 plasmid DNA를 분리한 후 제한효소를 처리하여 0.8% agarose 겔에 전기영동한 결과 pBI 121의 13 Kb와 2.17 Kb의 DNA 밴드를 확인하였다(Fig. 1). 선발 유전자로 NPT II gene을 이용하기 위하여 발아한 자 일주일 된 밀의 뿌리조직 절편을 kanamycin 농도를 달리한 캘러스 유도배지에 치상하여 3주 후 캘러스 형성 정도로서 kanamycin 내성을 조사하였다(Table 1). 형질전환되지 않은 절편의 경우 kanamycin이 첨가되지 않은 배지에서는 100%의 형성률을 보였으며, 캘러스 유도배지 내의 kanamycin

**Table 1.** The effect of kanamycin concentration added to culture medium after 3 weeks.<sup>a</sup>

Kanamycin conc(mg/L)	0	50	100	200	300	400	500	800
Callus induction	++	++	++	+	-	-	-	-

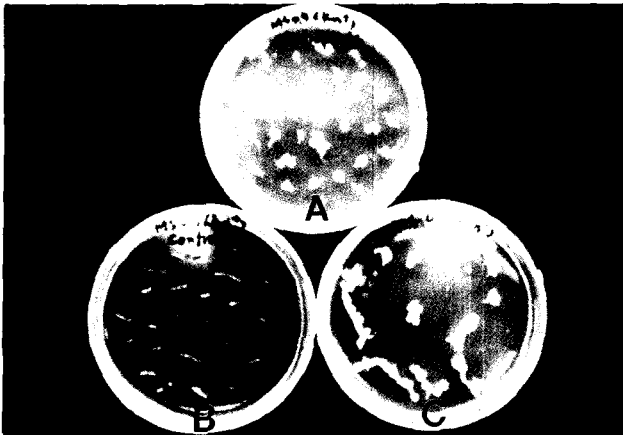
<sup>a</sup>++: active growth; +: limited growth; -: no growth.



**Figure 2.** The relationship of field strength and callus formation on root segments after electroporation with pBI 121.

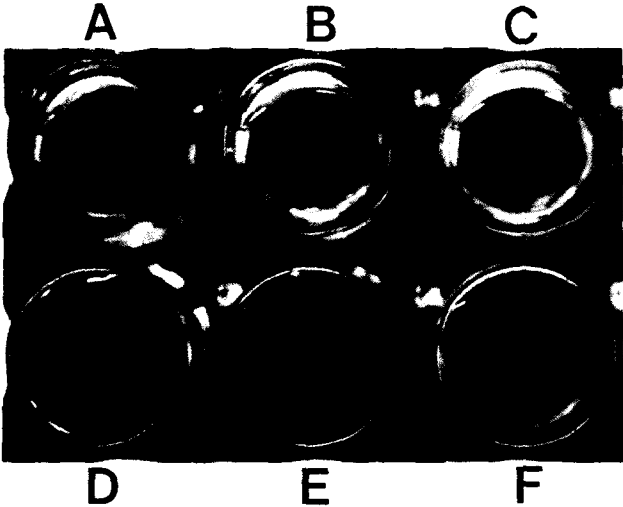
농도가 400 mg/L까지는 캘러스를 유도할 수 있었으나 300 mg/L-400 mg/L이 첨가되었을 때는 처음에는 드물게 캘러스가 형성되지만 시간이 지남에 따라 점차 괴사를 일으켰다. 따라서 본 실험에서는 형질전환된 캘러스 선발을 위하여 kanamycin 300 mg/L을 선발농도로 이용하였으며 계대배양후 형질전환된 캘러스만을 선발할 수 있었다. kanamycin에 대한 식물체의 내성정도는 식물에 따라 각각 다르게 보고되어 있는데 알팔파(Chabaud et al., 1985)의 경우 25 mg/L 이하의 낮은 농도 하에서 생장이 억제되어 kanamycin 내성 농도가 비교적 낮게 나타나는 반면 최근 Hauptmann 등(1988)의 보고에 의하면 *Triticum monococum*을 비롯한 일부 단자엽 식물의 경우 800 mg/L 이상의 높은 농도하에서 생장이 가능하다고 하였다. 본 실험에 사용된 kanamycin 선발농도는 300 mg/L 이상으로서 밀의 경우 kanamycin에 대한 저항성이 높은 것으로 나타났으며, kanamycin 저항성 유전자를 이용한 형질전환 세포주의 선발방법에는 복합유전자 사용 등의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

형질전환시 electroporation의 최적 조건을 구하기 위하여 전압과 capacitance를 각각 달리하여 처리한 결과 200 V/800 nF에서 2.5%로 가장 높은 캘러스 형성률을 나타내었으며 무처리구에서는 전혀 형성되지 않았다(Fig. 2). Yang 등(1988)은 2000 V/40 nF에서 가장 높은 벼 형질전환 캘러스를 얻을 수 있었다고 보고하였으며 Dekeyser 등(1990)은 375



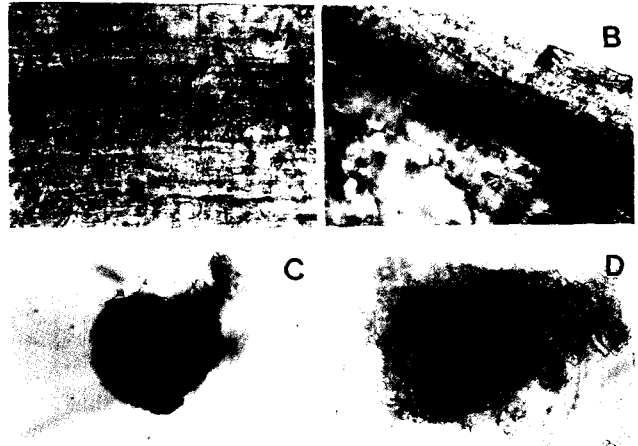
**Figure 3.** Formation of calli on root segments subjected to electroporation.

- A: Root segments formed calli after electroporation with pBI121 when cultured on medium containing 300mg/L kanamycin.
- B: Root segments did not formed calli after electroporation without pBI121 when cultured on medium containing 300mg/L kanamycin.
- C: Root segments which were not subjected to electroporation formed calli when cultured on medium without kanamycin.



**Figure 4.** Qualitative fluorometric assay of GUS activities in transformed calli. Well A-C: transformed calli; Well D-F: non-transformed calli.

V/ 900 uF에서 최적 수준을 유지한다고 보고하였는데 이러한 차이는 식물재료, electroporation buffer, 세포크기, age, 그리고 세포막 구성 등의 다양한 차이에 기인한 것으로 알려지고 있다(Hauptmann et al., 1987). 특히 electroporation에 의한 조직으로의 형질전환 유도에는 식물재료나 voltage, capacitanc 등이 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며(Dekeyser et al., 1990; D'Halluin et al., 1992), 본 실험의



**Figure 5.** Expression of the GUS gene in electroporated root segments and their calli treated with X-Gluc.

- A: transformed root segment; B: non-transformed root segment;
- C: transformed callus; D: non-transformed callus.

결과 형질전환된 캘러스를 유도하는 뿌리조직의 기계적 상처와 전기적 충격은 외래 유전자가 도입된 캘러스 유도와 성장에 영향을 거의 주지 않는 것으로 여겨 지지만 400 V 이상의 조건 하에서는 캘러스 형성이 어려웠으며 아마도 전기적 충격으로 인한 세포막의 파괴 등에 기인한 것으로 여겨진다.

배양 4주 후 뿌리조직의 절편으로부터 새로이 형성된 캘러스를 얻을 수 있었으며(Fig. 3), GUS 유전자의 도입 및 발현여부를 검정하고자 Jefferson 등(1987)의 방법에 따라 분석하였다. GUS 활성(O.D.)을 분광분석에 의해 측정한 결과 415 nm에서 최대 흡광도(1.417)를 나타냈으며, GUS 발현량의 분광 형광분석 결과 형질전환 캘러스는 793 pmol Mu/min/mg protein이었으며 UV하에서 형광반응을 보였으나 대조구에서는 형광 반응이 나타나지 않아 이들 캘러스의 형질전환을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 또한 GUS 조직화학적 분석결과 electroporation시킨 절편과 kanamycin이 함유된 배지에서 배양 4주 후 선발된 캘러스는 대조구와는 달리 GUS 활성을 나타내는 청색반응을 나타냄으로써 형질전환 유무를 확인할 수 있었다(Fig. 5). 이러한 결과는 기계적인 상처부위를 통하여 plasmid DNA가 밀 조직내의 genome으로 삽입되어 형질전환된 조직만이 kanamycin이 첨가된 배지에서 캘러스를 형성하는 것으로 여겨지며 또한 electroporation에 의한 절편내로의 외래 유전자 도입은 그 후의 절편유래 캘러스 형성에 있어서도 안정적으로 나타남을 보여주었는데 이는 D'Halluin 등(1992)의 보고와 일치하는 것으로 나타났다. Hu 등(1990)은 reporter gene으로 사용되고 있는 *E. coli*의  $\beta$ -glucuronidase와 유사한 효소활성을 몇몇 종자식물의 기관과 조직에서 확인하였음을 보고하였는데, 본 실험 결과 형질전환된 조직에서는 강한 GUS활성을

본 연구는 1993년도 교육부 기초과학연구조성비 지원에 의해 수행되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.



**Figure 6.** Dot blot hybridization of wheat callus formed on electroporated root segments. The 2.17 Kb fragment of GUS Nos-poly A labeled with  $^{32}\text{P}$  was used for the probe.

A: non-transformed callus B: transformed callus.

보였으나 대조구에서는 이러한 반응이 전혀 나타나지 않았으며 밀에서의 형질전환 실험에 GUS 유전자 사용이 가능함을 보여주었다.

Southern 분석 결과 GUS활성을 보이는 캘러스로부터 GUS 유전자를 확인할 수 있었으나, 반면 electroporation시키지 않은 절편유래의 캘러스로부터는 외래유전자가 관찰되지 않았다(Fig. 6). 따라서 이러한 결과는 electroporation에 의해 밀의 뿌리 조직내로 도입된 외래 유전자가 식물체 게놈내에 안정하게 삽입되어 있음을 나타내는 것으로 사료된다. 따라서 이와 같은 연구결과는 짧은 시간내에 형질전환 식물체를 얻을 수 있다는 이점과 더불어 원형질체 배양의 어려움으로 인하여 형질전환이 어려운 화본과 식물에 유용 유전자의 도입 및 발현에 대한 가능성을 제시해 주는 기초 자료가 될 수 있으리라 사료된다.

## 적 요

밀의 조직절편을 직접 유전자 전이에 의해서 형질전환시켰다. 기계적으로 잘려진 뿌리조직 절편은 pBI 121 plasmid DNA와 electroporation 방법으로 형질전환시켰으며 300 mg/L kanamycin을 함유하는 MS 배지에서 배양하였다. 형질전환된 캘러스는 배양한 지 5-7일 이내에 개시되었으며 4 주 후 선발되었다. 형질전환 효율의 최적수준은 200 V/ 800  $\mu\text{F}$ 이었으며 2.5%로 형성되었다. GUS 분석과 southern 분석은 뿌리절편과 절편유래 캘러스로부터 외래유전자의 발현과 안정한 형질전환이 이루어졌음을 보여주었다.

## 사 사

## 인 용 문 헌

- Ahloowalia BS (1982) Plant regeneration from callus culture in wheat. *Crop Sci* 22: 405-410
- Chaubaud M, Passiatore JE, Cannon F, Buchanan-Wollaston V (1985) Parameters affecting the frequency of kanamycin resistant alfalfa obtained by *A. tumefaciens* mediated transformation. *Plant Cell Rep* 7: 512-516
- Dekeyser RD, Claes B, De Rycke RMU, Habets ME, Van Montagu MC, Caplan AB (1990) Transient gene expression in intact and organized rice. *Plant Cell* 2: 591-602
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* 1: 19-21
- D'Halluin K, Bonne E, Bossut M, Beuckeleer MD, Leemans J (1992) Transgenic maize plants by tissue electroporation. *Plant Cell* 4: 1495-1505
- Fromm ME, Taylor TP, Walbot V (1986) Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* 319: 791-793
- Graves ACE, Goldmann SL (1986) The transformation of *Zea mays* with *Agrobacterium tumefaciens*: detection of T-DNA specific enzyme activities. *Plant Mol Biol* 7: 43-50
- Harris R, Martha W, Michael B, James V, Blanche B, Karel S (1988) Callus formation and plantlet regeneration from protoplasts derived from suspension cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep* 7: 337-340
- Hauptmann RM, Ozias-Akins P, Vasil V, Tabaeizadeh Z, Rogers SG, Horsch RB, Vasil IK, Fraley RT (1987) Transient expression of electroporated DNA in monocotyledonous and dicotyledonous species. *Plant Cell Rep* 6: 265-270
- Hauptmann RM, Vasil V, Ozias-Akins P, Tabaeizadeh Z, Rogers SG, Fraley RT, Horsch RB, Vasil IK (1988) Evaluation of selectable markers for obtaining stable transformants in the gramineae. *Plant Physiol* 86: 602-606
- Hess D, Dressler K, Nimmrichter R (1990) Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium* into the spikelets of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci* 72: 223-244
- Hwang B, Hwang SJ, Im WB, Im HT, Kang YH (1990) Studies on the induction of transformation in cereal plants. II. Expression of gene transferred into rice protoplasts by electroporation. *Korean J Biotechnol Bioeng* 5: 323-327
- Hwang B, Hwang SJ, Im HT, Kang YH (1993) Studies on the induction of transformation in cereal plants. III. Cultures and regeneration of rice protoplasts transferred foreign genes. *Korean J Biotechnol Bioeng* 1:

62-68

- Hu CY, Chee PP, Chesney RH, Zhou JH, Miller PD (1990) Intrinsic GUS-like activities in seed plants. *Plant Cell Rep* 9: 1-5
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion : B-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901-3907
- Joshi S, Vincentini AM (1990) Controlled cell wall regeneration for efficient microinjections of *N. tabacum* var. carlson protoplasts. *Plant Cell Rep* 9: 117-120
- Karp A, Wu QS, Steele SH, Jones MGK (1987) Chromosome variation in dividing protoplasts and cell suspensions of wheat. *Theor Appl Genet* 74: 140-146
- Lawence WA, Davies DR (1985) A method for the microinjection and culture of protoplasts at very low densities. *Plant Cell Rep* 4: 33-35
- Lindsey K, Jones MGK (1987a) The permeability of electroporated cells and protoplasts of sugarbeet. *Planta* 172: 346-355
- Lorz H, Baker B, Schell J (1985) Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. *Mol Gen Genet* 199: 178-182.
- Maniatis K, Kudo-shiratori A, Sambrook J (1982) Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Morikawa H, Iida A, Tamada Y (1989) Transient expression of foreign genes in plant cells and tissue obtained by a simple biolistic device. *App Microbial Biotech* 31: 320-322
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Oard JH, Paige DF, Simmond JA, Gradziel TM (1990) Transient gene expression in maize, rice and wheat cells using in airgun apparatus. *Plant Physiol* 92: 334-339
- Oard JH, Paige D, Dvorak J (1989) Chimeric gene expression using maize intron in cultured cells of breadwheat. *Plant Cell Rep* 8: 156-160
- Paszkowski J, Shillito RD, Saul M, ManDak M, Hoan T, Hoan B, Potrykus, I (1984) Direct gene transfer to plants. *EMBO J* 3: 2717-2722.
- Potrykus I, Michael W, Petruska SJ, Paszkowaski J, Raymond D, Shillito RD (1985) Direct gene transfer to cells of a graminaceous monocot. *Mol Gen Genet* 199: 183-188.
- Shafer W, Gorz A, Kahl G (1987) T-DNA integration and expression in a monocot crop plant after induction of *Agrobacterium*. *Nature* 327: 529-532
- Shillito RD, Saul MW, Paszkowski J, Muller M, Potrykus I (1985) High efficiency direct gene transfer to plants. *Bio/Technology* 3: 1099-1103.
- Toriyama K, Arimoto Y, Uchimiyama H, Hinata K (1988) Transgenic rice plants after direct gene transfer into protoplasts. *Bio/Technology* 6: 1072-1074.
- Vasil V, Brown SM, Re D, Fromm ME, Vasil IK (1991) Stably transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. *Bio/Technology* 9: 743-747
- Vasil V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK (1992) Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology* 10: 667-674
- Yang H, Zang HM, Davey MR, Mulligan BJ, Cocking EC (1988) Production of kanamycin resistant rice tissues following DNA uptake into protoplasts. *Plant Cell Rep* 7: 421-425
- Zhou H, Stiff CM, Konzak CF (1993) Stably transformed callus of wheat by electroporation-induced direct gene transfer. *Plant Cell Rep* 12: 612-616

(1994년 6월 23일 접수)